

PCT

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional



SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

| | | |
|---|--|---|
| (51) Clasificación Internacional de Patentes⁵ : C12Q 1/68, 1/70 | A2 | (11) Número de publicación internacional: WO 93/25707 (43) Fecha de publicación internacional: 23 de diciembre de 1993 (23.12.93) |
| (21) Solicitud internacional: PCT/ES93/00048 (22) Fecha de presentación internacional: 4 de junio de 1993 (04.06.93) (30) Datos relativos a la prioridad: P9201174 5 de junio de 1992 ES (05.06.92) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO DE SALUD CARLOS III [ES/ES]; Sinesio Delgado, 6-Pabellón 3, E-28029 Madrid (ES). (72) Inventor; e (75) Inventor/solicitante (sólo US) : TENORIO MATANZO, Antonio [ES/ES]; Sinesio Delgado, 6-Pabellón 3, E-28029 Madrid (ES). | (74) Mandatario: BORRELL ANDRES, José; Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado, 6, Pabellón, 3, E-28029 Madrid (ES). (81) Estados designados: AU, CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe.</i> | |
| (54) Title: METHODS FOR AMPLIFICATION OF GENOME AND MIXTURES OF INITIATOR OLIGONUCLEOTIDES FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF RELATED GENOMIC SEQUENCES (54) Título: PROCEDIMIENTOS DE AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE SECUENCIAS GENOMICAS RELACIONADAS (57) Abstract <p>The mixtures used for the detection reaction are obtained as a simple addition of oligonucleotides, contain homologous sequences selected amongst related genomic sequences and may comprise non homologous sequences and/or changes with respect to known sequences. The mixtures used for the identification reaction, consecutive to the detection or not, are obtained by addition of oligonucleotides, terminate at their extremity 3' by a sequence specific to the sequence to be typified, are configured so that the specific amplified fragments are different between each other as to the size or as to any other physical or chemical marking and may comprise changes with respect to known sequences. The new processes and mixtures are specially used for the detection and typing of related infectious agents, specially related viruses.</p> (57) Resumen <p>Las mezclas utilizadas para la reacción de detección se obtienen como suma simple de oligonucleótidos, contienen secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicas relacionadas y pueden contener secuencias no homólogas y/o alteraciones respecto a las secuencias conocidas. Las mezclas utilizadas para la reacción de identificación, consecutiva o no a la de detección, se obtienen como suma de oligonucleótidos, terminan en su extremo 3' en una secuencia específica de la secuencia a tipificar, están diseñadas de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño u otro marcaje físico o químico y pueden contener alteraciones respecto a las secuencias conocidas. Los nuevos procedimientos y mezclas son especialmente utilizables para la detección y tipificación de agentes infecciosos relacionados, especialmente de virus relacionados.</p> | | |

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

| | | | | | |
|----|--------------------------|----|----------------------|----|---------------------------|
| AT | Austria | FI | Finlandia | MN | Mongolia |
| AU | Australia | FR | Francia | MR | Mauritania |
| BB | Barbados | GA | Gabón | MW | Malawi |
| BE | Bélgica | GB | Reino Unido | NL | Países Bajos |
| BF | Burkina Faso | GN | Guinea | NO | Noruega |
| BG | Bulgaria | GR | Grecia | NZ | Nueva Zelanda |
| BJ | Benin | HU | Hungria | PL | Polonia |
| BR | Brasil | IE | Irlanda | PT | Portugal |
| CA | Canadá | IT | Italia | RO | Rumania |
| CF | República Centroafricana | JP | Japón | RU | Federación de Rusia |
| CG | Congo | KP | República Popular | SD | Sudán |
| CH | Suiza | | Democrática de Corea | SE | Suecia |
| CI | Côte d'Ivoire | KR | República de Corea | SK | República Eslovaca |
| CM | Camerún | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CS | Checoslovaquia | LK | Sri Lanka | SU | Unión Soviética |
| CZ | República Checa | LU | Luxemburgo | TD | Chad |
| DE | Alemania | MC | Mónaco | TC | Togo |
| DK | Dinamarca | MG | Madagascar | UA | Ucrania |
| ES | España | ML | Mali | US | Estados Unidos de América |

Título

PROCEDIMIENTOS DE AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE SECUENCIAS GENOMICAS RELACIONADAS

5

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos procedimientos y mezclas utilizados para la detección y la identificación de secuencias genómicas relacionadas, especialmente de agentes infecciosos relacionados, especialmente de virus relacionados. Los nuevos procedimientos y mezclas son especialmente útiles para realizar de manera simple, rápida y económica el diagnóstico de infección por agentes relacionados entre sí, especialmente el diagnóstico de infección por virus relacionados entre sí.

Definiciones

El término "iniciador", según se aquí se utiliza, define una molécula o mezcla de moléculas que contiene(n) más de tres deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; puede existir naturalmente, ser un fragmento de un enzima de restricción o ser producido sintéticamente. Cuando está en condiciones adecuadas, es capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de una hebra de ácido nucleico complementaria a la hebra con la cual es capaz de hibridar.

El término "amplificación de genoma", según aquí se utiliza, define cualquier procedimiento de amplificación exponencial de genoma que utiliza iniciadores según se han definido.

El término "grado de degeneración", según aquí se utiliza, define el número de diferentes moléculas presentes en un iniciador.

El término "zona conservada", según aquí se utiliza, define una zona homóloga en diferentes genomas. La homología es preferiblemente mayor del 50%, más preferiblemente mayor del 70% y más preferiblemente aún, mayor del 90%.

El término "secuencia genómica relacionada", según aquí se utiliza, define una secuencia genómica que incluye al menos dos zonas conservadas.

Estado de la técnica

Con frecuencia, el laboratorio de diagnóstico se encuentra ante la necesidad de realizar diferentes ensayos para la detección e identificación de organismos relacionados, especialmente de agentes infecciosos. En este sentido, son frecuentes los síndromes que pueden ser causados por agentes infecciosos diferentes, pero generalmente relacionados entre sí. Mononucleosis infecciosa en la infancia, meningitis, meningoencefalitis y encefalitis en población adulta y neumonitis, hepatitis, esofagitis o nefritis en enfermos con inmunodepresión celular son algunos ejemplos de síndromes que pueden ser debidos a diferentes miembros de la familia herpesviridae. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida, por otra parte, es otro ejemplo de síndrome producido por diferentes miembros de la familia retroviridae.

Existen métodos ya descritos que permiten la detección de agentes infecciosos relacionados entre sí. La hibridación con sondas en zonas relativamente conservadas o el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de epítomos comunes son métodos clásicos pero con problemas de sensibilidad y especificidad.

Otros métodos alternativos se han hecho posibles tras la descripción de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) por Saiki et al. (Science 230, 1350 y Nature 324: 163), por Mullis en la Patente U.S. N° 4.683.195, por Mullis et al. en la Patente U.S. N° 4.683.202 y por CETUS en la Solicitud de Patente Europea 201.184. Las patentes describen procedimientos para detectar la presencia o ausencia de al menos una secuencia específica de ácido nucleico en una muestra que contiene una mezcla de secuencias. Esencialmente, el procedimiento consiste en efectuar un número de amplificaciones cíclicas en las cuales los iniciadores, específicos de la secuencia que se desea amplificar, delimitan los extremos de la secuencia amplificada. Cada uno de los ciclos esencialmente consiste en tres etapas: desnaturalización de la doble hebra del genoma, hibridación de los iniciadores y elongación de la cadena; la repetición del ciclo conduce a una acumulación exponencial del fragmento de genoma delimitado por los iniciadores.

Tomando como metodología básica la PCR, se han descrito diferentes métodos de amplificación de secuencias de organismos relacionados, utilizando iniciadores con un elevado grado de degeneración seleccionados en zonas conservadas entre los organismos relacionados. El método se ha descrito para diferentes familias de virus, entre ellas para herpesviridae por Numberg et al (J. Virol. 63: 3240), para retroviridae por Donehower et al. (J. Virol. Methods, 28: 33) y Shih et al. (J. Virol. 63: 64), para hepadnaviridae por MacK y Sninsky (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6977) y para papillomaviridae por Ting y Manos (en PCR PROTOCOLS, Academic Press). Aunque los métodos descritos permiten la amplificación de organismos relacionados con una única combinación de iniciadores, el uso de un elevado grado de degeneración conduce generalmente a una escasa sensibilidad de detección, debida a la pequeña proporción de iniciador específico de la secuencia presente en la muestra a amplificar, al tiempo que a una escasa especificidad, mayor cuanto menor sea la

longitud de los iniciadores. Con los métodos descritos, la escasa especificidad es en la mayoría de los casos difícil de solucionar, ya que las secuencias conservadas no suelen ser mayores de 4 ó 5 aminoácidos; así, cuando se ensaya el método sobre muestras complejas que contienen genoma de gran tamaño, por ejemplo el humano, los iniciadores son capaces de hibridar inespecíficamente con zonas del genoma similares.

Por otra parte, aunque las patentes anteriores reivindican al menos una secuencia y afirman que pueden amplificarse al mismo tiempo múltiples secuencias, no aportan un procedimiento efectivo para amplificar múltiples secuencias al mismo tiempo. La adición de iniciadores para una segunda secuencia es normalmente posible, pero cuando se añaden iniciadores para más de dos secuencias, el procedimiento falla y produce un gran número de amplificaciones inespecíficas.

Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto describir nuevos procedimientos y mezclas para la detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas.

Un aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de secuencias genómicas relacionadas en una única mezcla de reacción, caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla caracterizada

- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,
- iii) por poder incluir además, cada uno de los

oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y

- 5 iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

- 10 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

El uso de las mezclas y el procedimiento previamente descritos mejoran tanto la sensibilidad como la
15 especificidad de la reacción de amplificación de genoma. La mejora en la sensibilidad se logra disminuyendo al máximo el grado de degeneración de iniciadores diseñados en una zona conservada entre diferentes secuencias relacionadas, especialmente en una zona conservada el genoma de agentes
20 infecciosos relacionados. En la técnica anterior, el grado de degeneración era siempre superior al número de diferentes agentes que se podrían amplificar, por lo que la concentración efectiva de cada uno de los iniciadores estaba tanto más disminuida cuanto mayor fuera el grado de
25 degeneración.

Por otra parte, la mejora en la especificidad se logra aumentando, si es necesario, la longitud de los iniciadores mediante la introducción de secuencias correspondientes a
30 zonas no conservadas entre las diferentes secuencias relacionadas que se quieren amplificar. De este modo se evitan los problemas derivados de la amplificación con iniciadores degenerados según la técnica anterior. La escasa longitud que generalmente tienen las zonas
35 conservadas entre secuencias relacionadas no es normalmente suficiente para evitar que los iniciadores diseñados en esas zonas hibriden inespecíficamente con secuencias

similares presentes en genomas con elevada complejidad, como el humano. El aumento en la longitud de los iniciadores según la invención disminuye la probabilidad de hibridación inespecífica con secuencias similares presentes en genomas complejos.

Las mezclas y el procedimiento anteriormente descritos son especialmente útiles para la detección, utilizando una única mezcla de reacción, de diferentes secuencias genómicas relacionadas, especialmente para la detección de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección y la identificación de secuencias genómicas en una única mezcla de reacción caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla caracterizada

- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,
- iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y
- iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de

detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas en dos reacciones de amplificación consecutivas, caracterizado por

- 5 i) hacerse una primera reacción de amplificación de
genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados
es en una mezcla como la utilizada en el primer
procedimiento descrito y
ii) tomando como sustrato el producto de la primera
10 reacción, realizar una segunda reacción de amplificación de
genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados
es una mezcla como la utilizada en el segundo procedimiento
descrito.

- 15 El procedimiento anteriormente descrito permite
realizar tanto la detección como la identificación de
secuencias genómicas relacionadas, especialmente de
secuencias correspondientes a agentes infecciosos
relacionados, en dos reacciones de amplificación
20 consecutivas.

- Según la invención, la mezcla compleja de iniciadores
utilizada en la segunda reacción no produce las
amplificaciones inespecíficas derivadas de su uso en
25 presencia de un genoma complejo. Esto se logra utilizando
como genoma sustrato de la reacción un polinucleótido
obtenido en la primera reacción de amplificación. La
amplificación "multiplex" según la invención tiene como
principal ventaja el poder realizar diferentes reacciones
30 de identificación utilizando una única mezcla de reacción,
lográndose una importante mejora en la metodología del
diagnóstico.

- Las mezclas y el procedimiento anteriormente descritos
35 son especialmente útiles para la detección y la
tipificación de diferentes secuencias genómicas
relacionadas, especialmente para la detección de agentes

infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados.

Otro aspecto de la invención son mezclas de oligonucleótidos diseñadas para ser utilizadas como iniciadores de una reacción de amplificación, caracterizadas porque al menos uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla se diferencia de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

La alteración de la secuencia según la invención, tiene como principal objetivo lograr que las mezclas complejas de iniciadores sean compatibles entre sí; es decir, que no se produzcan hibridaciones entre los diferentes componentes de las mezclas de oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Las hibridaciones entre oligonucleótidos, frecuentes en mezclas complejas, producen durante la reacción de amplificación secuestro del reactivo necesario y, a menudo, la formación de dímeros de iniciadores.

Una realización de la invención es la aplicación de las mezclas y los procedimientos anteriormente descritos a la detección de agentes infecciosos relacionados, especialmente de virus relacionados, más especialmente de virus pertenecientes a la misma familia y aún más especialmente de virus pertenecientes a la familia herpesviridae o de virus pertenecientes a la familia retroviridae, muy especialmente aquéllos capaces de infectar a humanos.

Los siguientes Ejemplos y Figuras ilustran, pero no limitan, algunos de los modos de llevar a cabo la invención.

Descripción de las figuras**Figura 1**

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes polimerasa de los 6 herpesvirus humanos: herpes simplex tipo 1 (HSV1), herpes simplex tipo 2 (HSV2), virus varicela-zóster (VZV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipo 6 (HHV6) y virus de Epstein-Barr (EBV). HHVCON representa los aminoácidos conservados entre todos los herpesvirus humanos. Las zonas conservadas homólogas a la ADN-polimerasa α humana (HUMANA) están subrayadas.

Figura 2

Alineamiento de aminoácidos de las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las secuencias homólogas "IYGDTD" y "KK.Y.G". Se representan también las secuencias homólogas a "IYGDTD" de la ADN-polimerasa α humana, y de las ADN-polimerasas de levadura, virus vaccinia, adenovirus 2 y los bacteriófagos T4 y ϕ 29.

Figura 3

Alineamiento de nucleótidos de las hebras codificantes para las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las zonas conservadas "IYGDTD" y "KK.Y.G".

Figura 4

Alineamiento de aminoácidos de las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". HRVCON representa los aminoácidos conservados entre todos los retrovirus humanos. Las letras en mayúscula son aminoácidos presentes en todos los aislados conocidos, las letras minúsculas son aminoácidos preferentes y el signo de interrogación indica que en ese lugar no hay ningún aminoácido preferente. Las secuencias se han obtenido analizando 15 aislados de HIV1, 8 aislados de HIV2, 1 de HTLVI y 1 de HTLVII.

Figura 5

Alineamiento de nucleótidos para las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". Las letras en mayúscula son nucleótidos presentes en todos los aislados conocidos, las letras minúsculas son nucleótidos preferentes y el signo de interrogación indica que en ese lugar no hay nucleótido preferente. Las secuencias se han obtenido analizando 15 aislados de HIV1, 8 aislados de HIV2, 1 de HTLVI y 1 de HTLVII.

Figura 6

1 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 3. Además del marcador de peso molecular (M), que contiene un fragmento de 123 pares de bases (bp) y sus múltiplos enteros, los fragmentos de 194 bp generados por amplificación de agua (H_2O) como control negativo y de genoma humano en presencia de los herpesvirus HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV.

20

2 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 8. Además del marcador de peso molecular, los fragmentos de 156 bp para HSV1 y HSV2, 144 bp para VZV, 131 bp y 166 bp para CMV, 119 bp para HHV6 y 95 bp para EBV.

25

Figura 7

(a) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de la primera amplificación generados en el Ejemplo 10. Además del marcador de peso molecular (M) que contiene fragmentos de 75 142, 154, 200, 220 298, 344, 394 y 516 bp, los fragmentos de 194 bp generados por amplificación de agua (O) como control negativo, de genoma humano en ausencia (H) o presencia de los herpesvirus HSV1 (1), HSV2 (2), VZV (3), CMV (4), HHV6 (5) y EBV (6) y de las muestras clínicas A, B, C, D y E.

30

35

- b) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de la segunda amplificación generados en el Ejemplo 10. Además del marcador de peso molecular, los fragmentos de 120 bp para HSV1 y HSV2, 98 bp para VZV, 78 bp para CMV, 66 bp para HHV6 y 54 bp para EBV.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diseño de iniciadores para la detección de herpesviridae humanos.

El bloque génico conservado entre los herpesviridae contiene un gen especialmente conservado, el de la ADN-polimerasa, cuya secuencia de aminoácidos se refleja en la Figura 1. Se seleccionan, entre otras posibilidades, las secuencias relacionadas que comprenden las zonas conservadas "IYGDTD", conservada incluso para la ADN-polimerasa α humana, y la "KK.Y.G", sólo presente en herpesviridae. Las secuencias de aminoácidos relacionadas y las secuencias de las hebras codificantes de los herpesvirus humanos correspondientes a las secuencias relacionadas elegidas se reflejan en las Figuras 2 y 3, respectivamente. A partir del análisis de las secuencias relacionadas, se diseñan los siguientes iniciadores:

POLARIDAD POSITIVA:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada "IYGDTD":

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| iniciador HSV | 5'-cgc atc ATC TAC GGG GAC ACG GA |
| iniciador VZV | 5'-aag gtt ATA TAT GGA GAT ACG GA |
| iniciador CMV | 5'-cgg gtc ATC TAC GGG GAC ACG GA |
| iniciador HHV6 | 5'-gag gta ATT TAT GGT GAT ACG GA |
| iniciador VZV | 5'-cga gtc ATC TAC GGG GAC ACG GA |

Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

POLARIDAD NEGATIVA:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada "KK.Y.G":

5 iniciador HSV 5'-at gac GCC GAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador VZV 5'-at tac CCC AAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador CMV 5'-ac ttt ACC AAT GTA TCT TTT CTT
 iniciador HHV6 5'-tg tct ACC AAT GTA TCT TTT TTT
 iniciador EBV 5'-ag cac CCC CAC ATA TCT CTT CTT

10 Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

15 **Ejemplo 2. Diseño de iniciadores para la detección de retroviridae humanos.**

20 En el genoma de los retroviridae existe igualmente un gen especialmente conservado, el de la polimerasa. Se seleccionan las secuencias relacionadas que comprenden las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". Las secuencias se aminoácidos relacionadas y las secuencias de las hebras codificantes de los retrovirus humanos correspondientes a las secuencias relacionadas elegidas se reflejan en las Figuras 4 y 5, respectivamente. A partir del análisis de las secuencias relacionadas, se diseñan los siguientes iniciadores:

POLARIDAD POSITIVA:

30 Mezcla de los siguientes nucleótidos, seleccionados en la zona conservada "VLPQG":

 iniciador HIV1 5'-cag tac aat GTG CTT CCA CAG GG
 iniciador HIV2 5'-ata tat aag GTC TTA CCA CAG GG
 iniciador HTLVI 5'-gca tgg act GTC CTT CCA CAG GG
 iniciador HTLVII 5'-gcc tgg aga GTA CTC CCC CAA GG

35

 Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no

conservada están en minúsculas.

POLARIDAD NEGATIVA:

Mezcla de los siguientes nucleótidos, seleccionados en la zona conservada "QYMDD":

5 iniciador HIV1 5'-ac ata caa ATC ATC CAT GTA TTG
iniciador HIV2 5'-at taa gat ATC ATC CAT GTA CTG
iniciador HTLVI 5'-aa aag tat GTC ATC CAT GTA TTG
iniciador HTLVII 5'-ag gag aat GTC ATC CAT GTA CTG

10 Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

Ejemplo 3. Detección de herpesviridae humanos.

15

Se preparan muestras conteniendo genoma humano en presencia de herpesvirus. Un método simple de preparación de muestras consiste en el tratamiento durante 45 minutos a 56°C de la suspensión celular en 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8,3), 0,5% Tween 20TM, 100 µg/ml proteinasa K;

20 seguido de inactivación de la proteasa por incubación durante 10 minutos a 96°C y posterior enfriamiento de la muestra hasta 4°C.

25

Las muestras se amplifican con 30-40 ciclos de amplificación, con una temperatura de hibridación de los iniciadores que puede elegirse entre los 45 y los 55°C. La temperatura de desnaturalización de la muestra puede estar entre los 92 y los 96°C, preferiblemente 94°C. La

30 temperatura de extensión de la polimerización puede estar entre los 60 y los 80°C, preferiblemente 72°C. Los tiempos de cada ciclo pueden elegirse en el intervalo de 10 segundos a 2 minutos, preferiblemente 20 a 90 segundos, más preferiblemente 30 a 60 segundos y más preferiblemente 30

35 segundos.

La reacción transcurre en una solución de reacción que

contiene, además de la muestra, entre 10 nM y 10 μ M de cada uno de los componentes de las mezclas de iniciadores, preferiblemente entre 100 nM y 1 μ M y más preferiblemente 200 nM. El volumen de reacción puede elegirse entre 5 μ l y 500 μ l,, preferiblemente entre 10 μ l y 100 μ l y más preferiblemente es de 50 μ l.

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras conteniendo cada uno de los herpesvirus humanos (HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV). El análisis de los fragmentos generados se muestra en la Figura 6. Todos los herpesvirus humanos generaron fragmentos de 194 bp.

Ejemplo 4. Diseño de sondas para la identificación de herpesviridae humanos.

Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 3, se diseñan las sondas correspondientes a cada uno de los herpesvirus humanos a partir de las secuencias reflejadas en la Figura 3. Se eligen sondas solapantes, es decir, dirigidas a una zona no conservada entre los diferentes herpesvirus. Como zona se elige la que codifica para los aminoácidos AAGLTAV en HSV1, GEALVAM en HSV2, VEGIAKI en VZV, PQALVAR en CMV, NQSLRRI en HHV6 y ESETLRG en EBV. Las secuencias de nucleótidos son las siguientes:

| | |
|------------|-------------------------------|
| sonda HSV1 | 5'-CC GCC GGG CTG ACG GCC GTG |
| sonda HSV2 | 5'-GC GAA GCG CTG GTG GCC ATG |
| sonda VZV | 5'-TT GAG GGG ATA GCT AAA ATC |
| sonda CMV | 5'-CG CAG GCT CTG GTG GCG CGT |
| sonda HHV6 | 5'-AT CAG TCT CTG CGA AGG ATT |
| sonda EBV | 5'-AG AGC GAG ACC CTG CGC TTT |

Ejemplo 5. Diseño de sondas para la identificación de retroviridae humanos.

Para la identificación de los fragmentos generados a partir de los iniciadores diseñados en el Ejemplo 2, se

diseñan las sondas correspondientes a cada uno de los retrovirus humanos a partir de las secuencias reflejadas en la Figura 5. Se eligen, como en el Ejemplo anterior, sondas solapantes. Como zona no conservada se elige la que
 5 codifica para los aminoácidos QNPDIVIY de HIV1, ANPDVILI de HIV2, MFPTSTIV de HTLVI y AFPQCTIL de HTLVII. Las secuencias de nucleótidos son las siguientes:

| | |
|----------------|------------------------------------|
| sonda HIV1 | 5'-CAA AAT CCA GAC ATA GTG ATC TAT |
| sonda HIV2 | 5'-GCA AAC CCA GAT GTC ATT CTC ATC |
| 10 sonda HTLVI | 5'-ATG TTT CCC ACA TCG ACC ATT GTC |
| sonda HTLVII | 5'-GCC TTC CCC CAA TGC ACT ATT CTT |

Ejemplo 6. Diseño de iniciadores para la detección e
 15 identificación de herpesviridae humanos en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado.

Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 3, se diseñan los iniciadores para una segunda
 20 reacción de amplificación de modo que cada uno de los herpesvirus humanos amplificados genere un fragmento de diferente peso molecular. A partir de las secuencias reflejadas en la Figura 3, se seleccionan inicialmente los siguientes iniciadores de reacción de polaridad positiva:

| | |
|------------------|---|
| iniciador HSV | 5'-TG TGC CGC GGC CTC ACG G |
| 25 iniciador VZV | 5'-ATA GCT AAA ATC GGC GAG AAA ATG GCA CA |
| iniciador CMV | 5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA |
| iniciador HHV6 | 5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG |
| iniciador EBV | 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTG GC |

30 Analizando las posibles interacciones entre los diferentes oligonucleótidos de las mezclas de iniciadores, se observa la siguiente:

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| iniciador HSV | 5'-TGTGCCGCGGCCTCACGG |
| 35 | |
| | GGCACTCCGGCGCCGTGT-5' iniciador HSV |

y se decide la introducción de alteraciones en el extremo

5' de la secuencia del iniciador, modificándose así la mezcla de oligonucleótidos diseñada:

POLARIDAD POSITIVA:

5 iniciador HSV 5'-TG TGA AGC GGC CTC ACG G
 iniciador VZV 5'-ATA GCT AAA ATC GGC GAG AAA ATG GCA CA
 iniciador CMV 5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA
 iniciador HHV6 5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG
 iniciador EBV 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTG GC

10

Aunque en el Ejemplo no se describen iniciadores específicos de HSV1 y HSV2, la invención admite el diseño de dichos iniciadores específicos, que deberían terminar en alguna o algunas de las escasas diferencias que presentan las secuencias de estos virus.

15

Como mezcla de polaridad negativa se decide utilizar la mezcla de detección de polaridad negativa diseñada en el Ejemplo 1:

20

POLARIDAD NEGATIVA:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada "KK.Y.G":

 iniciador HSV 5'-AT GAC GCC GAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador VZV 5'-AT TAC CCC AAT GTA CTT TTT CTT
25 iniciador CMV 5'-AC TTT ACC AAT GTA TCT TTT CTT
 iniciador HHV6 5'-TG TCT ACC AAT GTA TCT TTT TTT
 iniciador EBV 5'-AG CAC CCC CAC ATA TCT CTT CTT

30 La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 156 bp para HSV1 o HSV2, 144 bp para VZV, 131 bp para CMV, 119 bp para HHV6 y 95 bp para EBV.

35 **Ejemplo 7. Diseño de iniciadores para la detección e identificación de retroviridae humanos en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado.**

Para la identificación de los fragmentos generados a partir de los iniciadores diseñados en el Ejemplo 2, se diseñan los iniciadores para una segunda reacción de amplificación de modo que cada uno de los retrovirus humanos amplificados genere un fragmento de diferente peso molecular. A partir de las secuencias reflejadas en la Figura 5, se seleccionan inicialmente los siguientes iniciadores de reacción, de polaridad positiva, todos ellos solapantes con la zona conservada "VLPQG":

POLARIDAD POSITIVA:

iniciador HIV1 5'-AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG AA
iniciador HIV2 5'-AAG GTC TTA CCA CAG GGA TGG AA
iniciador HTLVI 5'-ACT GTC CTT CCA CAG GGG TTT AA
iniciador HTLVII 5'-AGA GTA CTA CCC CAA GGG TTT AA

Como mezcla de polaridad negativa se diseña la siguiente mezcla de oligonucleótidos:

POLARIDAD NEGATIVA:

iniciador HIV1 5'-ATA GTT ATG TAC CTA CTA AAC ATA
iniciador HIV2 5'-CGT TTG GGT CTA CAG TAA GAG
iniciador HTLVI 5'-CGG CAG GAG TTG GGG TAC TCC
iniciador HTLVII 5'-TAC GTC GAC CGG GTA TAG GA

La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 129 bp para HIV1, 95 bp para HIV2, 77 bp para HTLVI y 65 bp para HTLVII.

Ejemplo 8. Detección de herpesviridae humanos e identificación por el peso molecular del fragmento amplificado.

Utilizando las mezclas de iniciadores de tipificación diseñadas en el Ejemplo 6, se reamplificaron, en las condiciones definidas en el Ejemplo 3, diluciones 1:1000 de los fragmentos de 194 bp generados en la reacción de detección del Ejemplo 3. Como se refleja en la Figura 6

18

5 todos los herpesvirus generaron el fragmento del peso molecular esperado. CMV generó además una segunda banda de peso molecular superior (166 bp) debida probablemente a hibridación inespecífica del iniciador de tipificación de EBV en el tercio 5' del fragmento de 194 bp de CMV:

iniciador EBV 5'-ACCCGGAGCCTGTTTGTGGC
: :: :::::
CMV CGGGTCATCTACGGGGACACGGACAGCGTGTTTGTCCGCTTTCGTGGCCTGA
10 CGCCGCAGGCTCTGGTGGCGCGTGGGCCCAGCCTGGCGCACTACGTGACGGC
CTGTCTTTTGTGGAGCCCGTCAAGCTGGAGTTTGAAAAGGTCTTCGTCTCT
CTTATGATGATCTGCAAGAAACGTTACATCGGCAAAGT

15 **Ejemplo 9. Segundo diseño de iniciadores para la detección e identificación de herpesviridae humanos en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado.**

20 Para aumentar la sensibilidad y especificidad de la reacción de identificación y en concreto para evitar la aparición de las bandas inespecíficas detectadas en el Ejemplo 8, se diseñan nuevos iniciadores para la segunda reacción de identificación de manera similar a como se hizo en el Ejemplo 6.

25 A partir de las secuencias reflejadas en la Figura 3, se seleccionan inicialmente los siguientes iniciadores de reacción de polaridad positiva:

30 iniciador HSV1 5'-GTG CTG TGC CGC GGC CGC AC
iniciador HSV2 5'-GTT TTG TGC CGC GGC CGC AC
iniciador VZV 5'-T GAG GGG ATA GCT AAA ATC G
iniciador CMV 5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA
iniciador HHV6 5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG
iniciador EBV 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTG GC

35

Teniendo en cuenta que sería posible utilizar un único oligonucleótido iniciador para la amplificación de HSV1 y

HSV2, se decide rediseñar un único oligonucleótido como iniciador de ambos, introduciendo en su secuencia una combinación de ambas:

5 iniciador HSV 5'-GTG TTG TGC CGC GGC CGC AC

Como mezcla de polaridad negativa se diseña la siguiente mezcla de oligonucleótidos:

10 **POLARIDAD NEGATIVA:**

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada "E.EK...":

iniciador HSV 5'-GGT GAA CGT CTT TTC GAA CTC
iniciador VZV 5'-TAT AAA AGT TTT TTC ACA CTC
15 iniciador CMV 5'-GAC GAA GAC CTT TTC AAA CTC
iniciador HHV6 5'-ACA TAA AAT CTT TTC AAA CTC
iniciador EBV 5'-GGA GAA GGT CTT CTC GGC CTC

Analizando las posibles interacciones entre los
20 diferentes oligonucleótidos de las mezclas de iniciadores,
así como entre ellos y las secuencias previamente
amplificadas en el Ejemplo 3, se deciden introducir las
siguientes modificaciones, en los oligonucleótidos
iniciadores de HSV y EBV de la mezcla de polaridad
25 positiva:

iniciador HSV 5'-GTG TTG TGC CGC GGT CGC AC
iniciador EBV 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTA GC
con lo que la mezcla de polaridad positiva finalmente
diseñada es:

30 **POLARIDAD POSITIVA:**

iniciador HSV 5'-GTG TTG TGC CGC GGT CGC AC
iniciador VZV 5'-T GAG GGG ATA GCT AAA ATC G
iniciador CMV 5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA
iniciador HHV6 5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG
35 iniciador EBV 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTA GC

La amplificación utilizando las mezclas diseñadas en

este Ejemplo debería generar fragmentos de 120 bp para HSV1 o HSV2, 98 bp para VZV, 78 bp para CMV, 66 bp para HHV6 y 54 bp para EBV.

5 **Ejemplo 10. Detección e identificación por el peso molecular del fragmento amplificado de herpesviridae humanos en presencia de genoma humano y en muestras clínicas que los contienen.**

10 Utilizando las mezclas de iniciadores de tipificación diseñadas en el Ejemplo 9, se reamplificaron, en las condiciones definidas en el Ejemplo 3, diluciones 1:1000 de los fragmentos de 194 bp generados en la reacción de
15 detección del Ejemplo 3, así como de diluciones 1:1000 de los fragmentos de amplificación generados, siguiendo la reacción de detección del Ejemplo 3, a partir de cinco muestras clínicas sospechosas de contener herpesvirus humanos. Como se refleja en la Figura 7 todos los
20 herpesvirus humanos generaron el fragmento del peso molecular esperado. Igualmente, pudo identificarse el herpesvirus humano presente en cada una de las cinco muestras clínicas, detectándose HSV en las muestras clínicas A (líquido cefalorraquídeo procedente de un paciente con encefalitis herpética) y B (líquido
25 cefalorraquídeo de un paciente con meningitis linfocitaria), VZV en la muestra C (líquido vesicular de un paciente con zóster cutáneo), CMV en la muestra D (orina de un niño con excreción urinaria de CMV) y EBV en la muestra
30 clínica E (sangre de un niño con un síndrome linfoproliferativo que se sospechaba producido por el virus EBV).

De este modo, el uso de dos reacciones de amplificación consecutivas utilizando mezclas de
35 iniciadores según la invención, permite la detección e identificación de herpesvirus humanos en muestras clínicas.

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de secuencias genómicas relacionadas en una única mezcla de reacción, caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla caracterizada
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
 - ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,
 - iii) por poder incluir además, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y
 - iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.
2. Una mezcla de oligonucleótidos para ser utilizada como iniciador en una reacción de amplificación de genoma, caracterizada
- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
 - ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,
 - iii) por poder incluir además, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no

homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y
iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado además porque posteriormente se identifican las secuencias amplificadas por hibridación o por una reacción de amplificación consecutiva.

4. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados además porque se utilizan para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

20

5. Un procedimiento de amplificación de genoma para la detección y la identificación de secuencias genómicas en una única mezcla de reacción caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla caracterizada

25

- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,
- iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y

30

35

- iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

5

6. Una mezcla de oligonucleótidos para ser utilizada como iniciador en una reacción de amplificación de genoma, caracterizada

- 10 i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de
15 amplificación,
iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la
20 mezcla, y
iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

25

7. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 5 y 6, caracterizados además porque se utilizan para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la
30 detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

35

8. Un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas en dos reacciones de amplificación consecutivas, caracterizado por

- i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma según la reivindicación 1 y
- ii) tomando como sustrato el producto de la primera reacción de amplificación, realizar una segunda reacción de amplificación de genoma según la reivindicación 5.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8 caracterizado además porque se utiliza para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

10. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 1 a 9 caracterizados además

- i) porque las secuencias de los oligonucleótidos componentes de las mezclas se seleccionan de entre las secuencias de los miembros de la familia retroviridae, especialmente de los genes gag y pol, y
- ii) porque se utilizan para la detección y la identificación de retroviridae, especialmente de retroviridae capaces de infectar a humanos.

11. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizados además por que utilizan como base al menos una de las siguientes mezclas de oligonucleótidos o de los homólogos en las hebras complementarias:

- i) 5'-CAGTACAATGTGCTTCCACAGGG
5'-ATATATAAGGTCTTACCACAGGG
5'-GCATGGACTGTCCTTCCACAGGG
5'-GCCTGGAGAGTACTCCCCCAAGG

25

ii) 5'-ACATACAAATCATCCATGTATTG
5'-ATTAAGATATCATCCATGTACTG
5'-AAAAGTATGTCATCCATGTATTG
5'-AGGAGAATGTCATCCATGTACTG

5

iii) 5'-AATGTGCTTCCACAGGGATGGAA
5'-AAGGTCTTACCACAGGGATGGAA
5'-ACTGTCCTTCCACAGGGGTTTAA
5'-AGAGTACTACCCCAAGGGTTTAA

10

iv) 5'-AATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGG
5'-AAGGTCTTACCACAGGGATGGAAAGG
5'-ACTGTCCTTCCACAGGGGTTTAA
5'-AGAGTACTACCCCAAGGGTTTAA

15

12. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 5 a 10, caracterizados además por que utilizan como base al menos una de las siguientes mezclas de oligonucleótidos o de los homólogos en las hebras complementarias:

20

i) 5'-ATAGTTATGTACCTACTAAACATA
5'-CGTTTGGGTCTACAGTAAGAG
5'-CGGCAGGAGTTGGGGTACTCC
5'-TACGTCGACCGGTATAGGA

25

ii) 5'-CTCTAAGATTTTGTGCTGCTAC
5'-GAGAATGACATCTGGGTTTGC
5'-ATCCATGTATTGGACAATGGTCG
5'-GGCTTGCCGAATGGGCTGCAGGATATGGGC

30

13. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 1 a 9 caracterizados además

35 i) porque las secuencias de los oligonucleótidos componentes de las mezclas se seleccionan de entre las secuencias de los miembros de la familia

herpesviridae, especialmente del bloque conservado que comprende los genes homólogos a los genes UL27, UL28, UL29 y UL30 del virus herpes simplex tipo 1, y

- 5 ii) porque se utilizan para la detección y la identificación de herpesviridae, especialmente de herpesviridae capaces de infectar a humanos.

10 14. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 1 a 9 y 13, caracterizados además por que utilizan como base al menos una de las siguientes mezclas de oligonucleótidos o de los homólogos en las hebras complementarias:

15 i) 5'-CGCATCATCTACGGGGACACGGA
5'-AAGGTTATATATGGAGATACGGA
5'-CGGGTCATCTACGGGGACACGGA
5'-GAGGTAATTTATGGTGATACGGA
5'-CGAGTCATCTACGGGGACACGGA

20 ii) 5'-ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT
5'-ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT
5'-ACTTTACCAATGTATCTTTTCTT
5'-TGTCTACCAATGTATCTTTTTTT
5'-AGCACCCCCACATATCTCTCTT

25 iii) 5'-GGTGAACGTCTTTTCGAACTC
5'-TATAAAAGTTTTTTCACACTC
5'-GACGAAGACCTTTTCAAACCTC
5'-ACATAAAATCTTTTCAAACCTC
30 5'-GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC

35 15. Procedimientos y mezclas según las reivindicaciones 5 a 9 y 13, caracterizados además por que utilizan como base al menos una de las siguientes mezclas de oligonucleótidos o de los homólogos en las hebras complementarias:

27

i) 5'-TGTGCCGCGGCCTCACGG
5'-ATAGCTAAAATCGGCGAGAAAATGGCACA
5'-GGGCCCAGCCTGGCGCACTA
5'-GCCAAACATATCACAGATCG
5'-ACCCGGAGCCTGTTTGTGGC

5

ii) 5'-GTGTTGTGCCGCGGTCGCAC
5'-TGAGGGGATAGCTAAAATCG
5'-GGGCCCAGCCTGGCGCACTA
5'-GCCAAACATATCACAGATCG
5'-ACCCGGAGCCTGTTT

10

1/13
FIGURA 1

| | | |
|--------|---|-------|
| HSV1 1 | MFSGGGGGLSPGGKSAARAASGFFAPAGPRGASR-GPPPCLRQ | |
| HSV2 1 | MFCAAGGPASPGGKSAARAASGFFAPHNPRGATQTAPPPCRRQ | |
| VZV 1 | | MAIRT |
| CMV | | |
| HHV6 1 | | MDSV |
| EBV 1 | | MSGG |
| HHVCON | | |

| | |
|--------|--|
| HSV1 | NFYNPYLSVPGTQQ-----KPTGPTQRHTYYSEC-----DEFR |
| HSV2 | NFYNPHLAQTGTQP-----KAPGPAQRHTYYSEC-----DEFR |
| VZV | GFCNPFLTQASGIKYNPRTGRGSNREFLHSYKTTM-----SSFO |
| CMV 1 | MFFNPYLSGGVTGGA-VAGGRRQRSQPGSAQSGKRPPQKQFL |
| HHV6 | SFFNPYLEANR-L-----KKKSRSYYI |
| EBV | LFYNPFLRPNKGLL-----KK-PDKEYL |
| HHVCON | F NP L |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | FIAPRVLDEDAPPEKRAGVHDGHLKRAPKV-YCGGDERDVLRV |
| HSV2 | FIAPRSLDEDAPAEQRTGVHDGRLRRAPKV-YCGGDERDVLRV |
| VZV | FLAPKCLDEDVPMEEKGVHVGTLSPRPKV-YCNGKEVPYLD |
| CMV | QIVPRGVMD-----GQTGLIKHKTGRLPLMFYREIK--HLLSH |
| HHV6 | RILPRGIMHD-----GAAGLIKVDCEPRMFYRDQ--YLLSK |
| EBV | RLIPKCD--QTP--GAAGVVDVRGPQPPLCDYQDSLTVVGGDE |
| HHVCON | P G P Y |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | GSGGFWRPRRSLWGGVDHAPAGFNPTVTVFHVYDILENVEHAY |
| HSV2 | GPEGFWPRRLRLWGGADHAPEGFDPTVTVFHVYDILEHVEHAY |
| VZV | RCSSPWPRRVNIWGEIDFRGDKFDPFRNTFHVYDIVETTEAA- |
| CMV | DMV--WPCP---WRETLVGRV-VGPIR--FHTYD--QTDEAVL |
| HHV6 | EMT--WPSL-----DIARSKD-YDHMRMKFHIYDAVET--LMF |
| EBV | DGKGMWWRQRAQEGTARPEADTH-GSPLDFHVYDILETVYTHE |
| HHVCON | W FH YD |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | GMRAAQFHARFMDAITPTGTVITLLGLT-PEGHRVAVHVGTR |
| HSV2 | SMRAAQLHERFMDAITPAGTVITLLGLT-PEGHRVAVHVGTR |
| VZV | ---SNGDVSRFATATRPLGTVITLLGMS-RCGKRVAHVHVGIC |
| CMV | FDSPENVSPRYRQHLVPSGNVLRFFGAT-EHGYSICVNVFGQR |
| HHV6 | TDSIENLPFQYRHVTPSGTVIRMFGRTE-EDGEKICVNVFGQE |
| EBV | KCAVIP-SDKQG-YVVP CGIVIKLLGRRKADGASVCNVFGQQ |
| HHVCON | P G V G G V V G |

HOM SUSTITUIDA

2/13

| | |
|--------|--|
| HSV1 | QYFYMNKEEVDRHLQCRAPRDL CERMAAALRES----- |
| HSV2 | QYFYMNKAEDVRHLQCRAPRDL CERLAAALRES----- |
| VZV | QYFYINKAEVD TACGIRSGSELSVLLAECLRSSMITQNDATLN |
| CMV | SYFYCEYS DTDRLREVIA-----SVGEL----- |
| HHV6 | QYFYCECVDGRSLKATIN-----NLML----- |
| EBV | AYFYASAPQGLDVEFAVL-----SALKA----- |
| HHVCON | YFY |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | -----PGASFRGISADHFEAEVVERTDVYYYETRPALFYRVY |
| HSV2 | -----PGASFRGISADHFEAEVVERADVYYYETRPITYRVY |
| VZV | GDKNAFHGTSFKSASPESFRVEVIERTDVYYYDTQPCAFYRVY |
| CMV | -----VPEPRTPYAVSVTPATKTSIYGYGTRPVPDLQCV |
| HHV6 | -----TGEVKMSCSFVIEPADKLSLYGYNANTVVNLFKV |
| EBV | -----STFDRRTPCRVSVEKVTRRSIMGYGNHAGDYHKIT |
| HHVCON | Y |

| | |
|--------|--|
| HSV1 | VRSGRVLSYLCDNF CPA--IKKYEGGVDATTRFILDNPGFVTF |
| HSV2 | VRSGRALAYLCDNF CPA--IRKYEGGVDATTRFILDNPGFVTF |
| VZV | SPSSKFTNYLCDNFHPE--LKKYEGRV DATTRFLMDNPGFVCF |
| CMV | SISNWTMARKIGEYLLLEQGFPVVEVRVDPLTRLVIDR-RITTF |
| HHV6 | SFGNGYVSQRIGKILQNEG FVVYEIDVDVLTRFFVDN-GPLSF |
| EBV | LSHPNSVCHVATWLQDKHGCRIFEANVDATRRFVLDN-DFVTF |
| HHVCON | E VD R D F |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | GWYRLKPGRNNTLAQPAAPMAFGTSSDVEFNCTADNLAIEGGM |
| HSV2 | GWYRLKPGRGNAQAQPRPPTAFGTSSDVEFNCTADNLAVEGAM |
| VZV | GWYQLKPGVDGERVRVPASRQLTSDVEIDCMSDNLQAIPND |
| CMV | GWCSVNR--YDWRQQGRASC-----DIEVDCDVSDLVAVPDD |
| HHV6 | GWYNVKK--YIPQDMGKGSNL-----EVEINCHVSDLVSL-ED |
| EBV | GWYSCRR--AIPRLQHRDSYA-----ELEYDCEVGDLVSRRED |
| HHVCON | GW E C L |

| | |
|--------|--|
| HSV1 | SDLPAYKLMCFDIECKAGGEDELAFFVAGHPEDLVIQISCLLY |
| HSV2 | CDLPAYKLMCFDIECKAGGEDELAFFVAERPEDLVIQISCLLY |
| VZV | DSWPDYKLLCFDIECKSGGSNELAFPDATHLEDLVIQISCLLY |
| CMV | SSWPRYRCLSF D IECMSG---EGGFPCAESDDIVIQISVCY |
| HHV6 | VNWPLYGCWSFDIECL-G---QNGNFPDAENLGDIVIQISVISF |
| EBV | SSWPSYQALAFDIECL-G---EEGFPTATNEADLILQISCVLW |
| HHVCON | P Y FDIEC G FP A D QIS |

HOJA SUSTITUIDA

3/13

| | | |
|--------|-----------------------------|---------------------|
| HSV1 | DLSTTALEHV----- | LLFSLGSCDL |
| HSV2 | DLSTTALEHI----- | LLFSLGSCDL |
| VZV | SIPROSLEHI----- | LLFSLGSCDL |
| CMV | ETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVI | FGHSGHLHFTIGTCGQ |
| HHV6 | DTEGD----- | RDER-----HLFTLGTCEK |
| EBV | STGEEAG----- | RYRR-----ILLTLGTCD |
| HHVCON | | L G C |

| | | |
|--------|-----------------|-------------------------------|
| HSV1 | PES-HLNELAARGLP | TPVVLEFDSEFEMLLAFMTLVKQYGPEF |
| HSV2 | PES-HLSDLASRGLP | APVVLEFDSEFEMLLAFMTFVKQYGPEF |
| VZV | PQR-YVQEMKDAGL | PEPTVLEFDSEFELLIAFMTLVKQYAPAF |
| CMV | VGPDV----- | DVYEFPSYELLGFMFFQRYAPAF |
| HHV6 | IDGVH----- | IYEFASEFELLGFFIFLRIESPEF |
| EBV | IEGVE----- | VYEFPSELDMLYAFFQLIRDLSVEI |
| HHVCON | | EF SE L F |
| HUMANA | | VEVAATERTLLGFFLAKVHKIDPDI |
| | | IV |

| | | |
|--------|---------------|---------------------------------|
| HSV1 | VTGYNIINFDWP | FLLAKLTDIYKVPLDGYGRMNGRGVFRVWDI |
| HSV2 | VTGYNIINFDWPF | VLTKLTEIYKVPLDGYGRMNGRGVFRVWDI |
| VZV | ATGYNIIVNFDW | AFIMEKLSIYSLKLDGYGSINRGGLFKIWDV |
| CMV | VTGYNINSFDLKY | ILTRLEYLYKVDSQRFCKLPTAQG----- |
| HHV6 | ITGYNINNFDLKY | LCIRMDKIYHYDIGCFSKLKNGKI----- |
| EBV | VTGYNVANFDWP | YILDRARHIYSINPASLGKIRAGGVCEVRR- |
| HHVCON | TGYN | FD Y |
| HUMANA | VTGHNIYGFE | LEVLLQR |

| | | | |
|--------|------------------|------------------------------|------------|
| HSV1 | GQS----- | HF-QKR----- | SKIKVNGM |
| HSV2 | GQS----- | HF-QKR----- | SKIKVNGM |
| VZV | GKS----- | GF-QRR----- | SKVKINGL |
| CMV | GRFFLHSPAV-GF-- | KRQYAAAFPSASHNPASTAATKVYIAGS | |
| HHV6 | GISVPHEQYRKGF | LQ----- | AQTKVFTSGV |
| EBV | ----PHD-AGKGFL-- | R----- | ANTKVRITGL |
| HHVCON | | F | K G |

| | | |
|--------|-----------------------|--------------------------------|
| HSV1 | VNIDMYGIITDKIKLSSYKLN | AVAEAVLKDKKKDLSYRDIPAY |
| HSV2 | VNIDMYGIITDKVKLSSYKLN | AVAEAVLKDKKKDLSYRDIPAY |
| VZV | ISLDMYAIAATEK | KLSSYKLDSVAREALNESKRDLPYKDIPGY |
| CMV | VVIDMYPVCHAKTNSPNYK | LNTMAELYLRQRKDDLSYKDIPRC |
| HHV6 | LYLDMYPVYSSKITAQNYK | LDTIAKICLGQEKEQLSYKEIPKK |
| EBV | IPIDMYAVCRDKLSLSDYK | LDTVARKLLGAKKEDVHYKEIPRL |
| HHVCON | DMY | K YKL A L K Y IP |

HOJA SUSTITUIDA

4/13

| | |
|--------|--|
| HSV1 | YAAGPAQRGVIGEYCIQDSLLVGQLFFKFLPHLELSAVARLAG |
| HSV2 | YASGPAQRGVIGEYCVQDSLLVGQLFFKFLPHLELSAVARLAG |
| VZV | YASGPNTRGIIIGEYCIQDSALVGKLFKFLPHLELSAVARLAG |
| CMV | FVANAEGRAQVGRYCLQDAVLVRDLFNTINFHYEAGAIARLAK |
| HHV6 | FISGPSGRAVVGKYCLQDSVLVVRLEFKQINYHFEVAEVARLAH |
| EBV | FAAGPEGRRRLGMYCVQDSALVMDLLNHFVIHVEVAEIAKIAH |
| HHVCON | R G YC QD LV L H E A A |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | APKRPAAREDEERPEEEGEDEDEREEG----GGEREPEGARE |
| HSV2 | INITRTIYDGGQIRVFTCLLRLAGQKGFILPDTQGRFRGLDKE |
| VZV | ITLTKAIDGQQVRIYTCLLGLASSRGFILPDGGYPATFEYKD |
| CMV | IPLRRVIFDGGQIRIYTSLLDECACRDFILPNHYSKGTTPET |
| HHV6 | VTARCVVFEGQQKIFPCILTEAKRRNMILPSMVSSHNRQ--- |
| EBV | IPCRRVLDDGQQIRVFSCLLAAQKENFILPMPSASDRD---- |
| HHVCON | GQQ L ILP |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | INITRTIYDGGQIRVFTCLLRLADQKGFILPDTQGRFRGAGGE |
| HSV2 | APKRPAVPRGEGEPGDGNGDEDKDDDEDGDEDGEREEVARE |
| VZV | VIPDVGDV-----EEEM-DEDE----- |
| CMV | NSVAVSPNAAIISTAAVPGDAGSVAAMFQMSPPLOQAPSSQDG |
| HHV6 | ----- |
| EBV | ----- |
| HHVCON | ----- |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | TA-----GRHVG |
| HSV2 | TG-----GRHVG |
| VZV | -----SVSP-T-GT-SS-----GRNVG |
| CMV | VSPGSGSNSSSSVGVFSVSGSGSGGVGVSDNHNHAGGTAAVSY |
| HHV6 | -----GIGY |
| EBV | -----GY |
| HHVCON | Y |
| HUMANA | AY |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | QGARVLDPTSGFHVNPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFSTLSLR |
| HSV2 | QGARVLDPTSGFHVDPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFSTLSLR |
| VZV | KGARVFDPTGFIYIDPVVVLDFAVLYPSIIQAHNLCFTTLTLN |
| CMV | QGATVFEPEVGYNDPVAVDFASLYPSIIQAHNLCYSTLLVP |
| HHV6 | KGATVLEPKTGYYAVPTVVVDFQSLYPSIMAHNLCYSTLVL- |
| EBV | QGATVIQPLSGFYNSPVLVVDFAVLYPSIIQAHNLCYSTMITP |
| HHVCON | GA V P G P V DF SLVPSI AHNLC T |
| HUMANA | AGGLVLDPKVGFYDKFILLDFNSLYPSIIQEFNICFTT |

II

HOJA SUSTITUIDA

5/13

| | |
|--------|--|
| HSV1 | ADAVAHLEA--GKDYLEIEVGGRRLLFFVKAHVRESLLSILLRD |
| HSV2 | PEAVAHLEAD--RDYLEIEVGGRRLLFFVKAHVRESLLSILLRD |
| VZV | FETVKRLNPS---DYATFTVGGKRLFFVRSNVRESLLGVLLKD |
| CMV | GGEYFVDPAD---VYSVTLENGVTHRFVRASVRVSVLSSELLNK |
| HHV6 | -DERQIAGLSESDILTVKLGDE-THRFVKPCIRESVLGSLKLD |
| EBV | GEEHRLAGLRPGEDYESFRLTGGVYHFVKKHVESFLASLLTS |
| HHVCON | FV S L LL |
| HUMANA | GLSTPARRK |
| | VI_ |

| | |
|--------|--|
| HSV1 | WLAMRKQIRSRIPQSS-PEEAVLLDKQQAIAIKVVCNSVYGFTG |
| HSV2 | WLAMRKQIRSRIPQSP-PEEAVLLDKQQAIAIKVVCNSVYGFTG |
| VZV | WLAMRKAIRARIPGSS-SDEAVLLDKQQAIAIKVVCNSVYGFTG |
| CMV | WVSQRRAVRECMRECQDPVRRMLLDKEQMALKVTCNAFYGFTG |
| HHV6 | WLAKRREVKAEMQNCSDPMKLLLDKKQLALKTTTCNSVYGFTG |
| EBV | WLAKRKAIAIKLLAACEDPRQRTILDKQQLAICTCNAVYGFTG |
| HHVCON | W R LDK Q A K CN YG TG |
| HUMANA | LVEDLLEVGT DIRQKALKLTANSMYGCLG |
| | III_ |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | VQHGLLPCLHVAATVTTIGREMLLATREYVHARWAAFEQLLAD |
| HSV2 | VQHGLLPCLHVAATVTTIGREMLLATRAYVHARWAEFDQLLAD |
| VZV | VAQGFLPCLYVAATVTTIGRQMLLSTRDYIHNNWAAFERFITA |
| CMV | VVNGMMPCLPIAASITRIGRDMLEARTAFIKDNFSEPCFLHNF |
| HHV6 | AAHGLLPCVAIAASVTCLGREMLCSTVDYVNSKMQSE----QF |
| EBV | VANGLFPCLSLAETVTLQGRMTLERAKAFVEALSPANLQALAP |
| HHVCON | G PC A T GR ML |
| HUMANA | FSYSRFYAKPLAALVTYKGREIL |

| | |
|--------|--|
| HSV1 | FPEAADMRAPGP-----YSMRIIY |
| HSV2 | FPEAAGMRAPGP-----YSMRIIY |
| VZV | FPGDISSVLSQKA-----YEVKVIY |
| CMV | FNQEDYVVGVTREGDSEESSALPEGLETSSGGSNERRVEARVIY |
| HHV6 | FC-EEFGL-----TSSDFTGD--LEVEVIY |
| EBV | SPDAWAPLNPE-----GQLRVIY |
| HHVCON | IY |
| HUMANA | VIIY |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | GDTDSIFVLCRGLTAAGLTAVGDKMASHISRALFLPPIKLECE |
| HSV2 | GDTDSIFVLCRGLTGEALVAMGDKMASHISRALFLPPIKLECE |
| VZV | GDTDSVFIIRFKGVSEGIKIGEKMAHIIISTALFCPPIKLECE |
| CMV | GDTDSVFRFRGLTPQALVARGPSLAHYVTACLFVEPVKLEFE |
| HHV6 | GDTDSIFMSVRNMVNQSLRRIAPMIAKHITDRLFKSPIKLEFE |
| EBV | GDTDSLFIIECRGFSESETLRFADALAAHTTSLFCAPISLEAE |
| HHVCON | GDTDS F A S LP P LE E |
| HUMANA | GDTDS |
| | I_ |

HOJA SUSTITUIDA

6/13

HSV1 KTFTKLLLI AKKKYIGVIYGGKML-IKGVDLVRKNNCAFINRT
 HSV2 KTFTKLLLI AKKKYIGVICGGKML-IKGVDLVRKNNCAFINRT
 VZV KTFIKLLLI TTKKYIGVIYGGKVL-MKGVDLVRKNNCQFINDY
 CMV KVFVSLMMICKKRYIGKVEGASGLSMKGVDLVRKTACEFVKGV
 HHV6 KILCPLILICKKRYIGR-QDDSLIFKGVDLVRKTSCDFVKGV
 EBV KTFSCMLITKKRYVGVLTGKTL-MKGVELVRKTACKFVQTR
 HHVCON K L I K K Y G L KGV LVRK C F

HUMANA

KQE-LKGLDIVRRDWC
 _____V_____

HSV1 SRALVDLLFYDDTVSGAAAALAERPAAEWLARPLPEGLQAFGA
 HSV2 SRALVDLLFYDDTVSGAAAALAERPAAEWLARPLPEGLQAFGA
 VZV ARKLVELLLYDDTVSRAAAEASCVSIAEWNRRAMPSPGMAGFGR
 CMV TRDVLSELLFEDREVSEAAVRLSRLSLDEVKKYGVPRGFWEILR
 HHV6 VKDIVDLLFFDEEVQTAAVEFSHMTQTQLREQGVVFIHKILR
 EBV CRRVLDLVLADARVKEAASLLSHRPFQESFTQGLPVGFLPCID
 HHVCON L D V AA P G

HSV1 VLVDHRRITDPERDIQDFVLTAEISRHPRAYTNKRLAHLTVY
 HSV2 VLVDHRRITDPERDIQDFVLTAEISRHPRAYTNKRLAHLTVY
 VZV IIADAHROITSPKLDINKFVMTAEISRPPSAYINRRLAHLTVY
 CMV RLVQARDDLYLHRVRVEDLVLSVLSKDISLYRQSNLPHIAVI
 HHV6 RLCEAREELFONRADVRHMLSSVLSKEMAAYKQPNLAHLSVI
 EBV ILNQAYTDLREGRVPMGELCFSTELSRKLSAYKSTQMPHLAVY
 HHVCON A LS Y H V

HSV1 YKLMARRAQVPSIKDRIPYVIVAQTREVEETVARLAA-LRELD
 HSV2 YKLMARRAQVPSIKDRIPYVIVAQTREVEETVARLAA-LRELD
 VZV YKLVMRQQQIPNVRERIPYVIVAPTDEVE-ADAKSVALLRG-D
 CMV KRLAARSEELPSVGDRVFYVLTAPGCRTAPQGSSDNGDSVTAG
 HHV6 RRLAQRKEEIPNVGDRIMYVLIAPSIGN-----
 EBV QKFVERNEELPQIHDRIQYVFVEPKGGV-----
 HHVCON R P R YV

HSV1 AAAPGDEPAPPAALPSAKRPRETPSPADPPG-GASKPRKLLV
 HSV2 AAAPGDEPAPPAALPSAKRPRETPSHADPPG-GASKPRKLLV
 VZV -----P-LQNTAGKRC-----GEAK-RKLI
 CMV VVSRSDAIDGTDDADGGGVEESNRRGGEPAKKRARKPPSAVC
 HHV6 -----KQTH-----
 EBV -----KGARKT-----
 HHVCON K

HOJA SUSTITUIDA

7/13

| | |
|--------|--|
| HSV1 | S-ELAEDPAYAIAHGVALNTDYYFSHLLGAACVTFKALF-GNN |
| HSV2 | S-ELAEDPGYAIARGVPLNTDYYFSHLLGAACVTFKALF-GNN |
| VZV | S-DLAEDPIHVTSHGLSLNIDYYFSHLIGTASVTFKALF-GND |
| CMV | NYEVAEDPSYVREHGVPPIHADKYFEQVLKAVTNVLSPVFPGGE |
| HHV6 | NYELAEDPNYVIEHKIPIHAEKYFDQIIKAVTNAISPIFPKTD |
| EBV | --EMAEDPAYAERHGVPVAVDHYFDKLLQGAANILQCLF-DNN |
| HHVCON | AEDP YF F |

| | |
|--------|---|
| HSV1 | A-KITESLLKRFI--PEVWHPPDDVAARLRTAGFGAVGAG--- |
| HSV2 | A-KITESLLKRFI--PETWHPPDDVAARLRAAGFGPAGAG--- |
| VZV | T-KLTERLLKRFI--PETRVVNVKMLNRLQAAGFVCIHAPCWD |
| CMV | TARKDK-FLH-MVL-PRRLHLEPAFLPYSVKAHECC |
| HHV6 | -IKKEK-LLL-YLL-PMKVYLDETFSIA-----EVM |
| EBV | S-GAALSVLQNFRTARPPF |
| HHVCON | L P |

| | | |
|------|---------------------------------|------|
| HSV1 | -----ATAEE-TRRMLHRAFDL-A | 1235 |
| HSV2 | -----ATAEE-TRRMLHRAFDL-A | 1240 |
| VZV | NKMTEAEITEEQSHQIMRRVFCIPKAILHQS | 1194 |
| CMV | | 1242 |
| HHV6 | | 1012 |
| EBV | | 1015 |

HOJA SUSTITUIDA

FIGURA 2

| | | | |
|----------|--------|--|-----------------|
| HSV1 | RIIYGD | TDSIFVLCRGLTAAGLTAVGDKMASHISRALFLPPIKLECEKTF | TKLLIIAKKKYIGVI |
| HSV2 | RIIYGD | TDSIFVLCRGLTGEALVAMGDKMASHISRALFLPPIKLECEKTF | TKLLIIAKKKYIGVI |
| VZV | KVIYGD | TDSVFIRFKGVSVEGIAKIGEKMAHIIISTALFCPPIKLECEKTF | IKLLITKKRYIGKV |
| CMV | RVIYGD | TDSVFRFRGLTPQALVARGPSLAHYVTACLFVEPVKLEFEKVFVSLMMI | CKKKRYIGKV |
| HHV6 | EVIYGD | TDSIFMSVRNMVNQSLRRRIAPMIAKHITDRLFKSPIKLEFEKILCPLIL | ICKKKRYIGRQ |
| EBV | RVIYGD | TDSLFIIECRGFSEETLRFADALAAHTTRSLFCAPISLEAEKTF | SCLMLITKKRYVGVL |
| Humana | IYGD | TDS | |
| Levadura | VYGD | TDS | |
| Vaccinia | VYGD | TDS | |
| Adeno 2 | VYGD | TDS | |
| T4 | AAGD | TDS | |
| φ29 | IYCD | TDS | |

9/13

FIGURA 3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| HSV1 | 5'- | CGC | ATC | ATC | ATC | TAC | GGG | GAC | ACG | GAC | TCC | ATA | TTT | GTG | CTG | TGC | CGC | GGC |
| HSV2 | 5'- | CGC | ATC | ATC | TAC | TAC | GGG | GAC | ACG | GAC | TCC | ATT | TTT | GTT | TTG | TGC | CGC | GGC |
| VZV | 5'- | AAG | GTT | ATA | TAT | GGA | GAT | ACG | GAT | TCT | GTG | TTT | ATC | ATC | CGA | TTC | AAG | GGT |
| CMV | 5'- | CGG | GTC | ATC | TAC | GGG | GAC | ACG | GAT | AGC | ATC | TTT | ATG | TCT | GTC | AGA | AAT | GGG |
| HHV6 | 5'- | GAG | GTA | ATT | TAT | GGT | GAT | ACG | GAT | TCG | CTG | TTT | ATC | GAG | TGC | CGG | GGG | |
| EBV | 5'- | CGA | GTC | ATC | TAC | GGG | GAC | ACG | GAC | TTT | GCC | GAT | GCC | CTG | GCC | CAC | ATC | |
| HSV1 | CTC | ACG | GCC | GCC | GGG | CTG | ACG | GCC | GTG | GGC | GAC | AAG | ATG | GCG | AGC | CAC | ATC | |
| HSV2 | GTT | ACG | GGC | GAA | GCG | CTG | GTG | GCC | ATG | GGC | GAC | AAG | ATG | GCG | AGC | CAC | ATC | |
| VZV | CTT | AGT | GTT | GAG | GGG | ATA | GCT | AAA | ATC | GGC | GAG | AAA | ATG | GCA | CAT | ATA | ATT | |
| CMV | CTG | ACG | CCG | CAG | GCT | CTG | GTG | GCG | CGT | GGG | CCC | AGC | ATG | GCG | CAC | TAC | GTG | |
| HHV6 | ATG | GTT | AAT | CAG | TCT | CTG | CGA | AGG | ATT | GCG | CCG | ATG | ATC | GCC | AAA | CAT | ATC | |
| EBV | TTT | TCA | GAG | AGC | GAG | ACC | CTG | CGC | TTT | GCC | GAT | GCC | CTG | GCC | GCC | CAC | ACC | |
| HSV1 | TCG | CGC | GCG | CTG | TTT | CTG | CCC | CCC | ATC | AAA | CTC | GAG | TGC | GAA | AAG | ACG | TTC | |
| HSV2 | TCG | CGC | GCG | CTG | TTT | CTC | CCC | CCC | ATC | AAG | CTC | GAG | TGC | GAA | AAA | ACG | TTC | |
| VZV | TCA | ACG | GCT | CTG | TTT | TGT | CTT | CCT | ATA | AAG | TTG | GAG | TGT | GAA | AAA | ACT | TTT | |
| CMV | ACG | GCC | TGT | CTT | TTT | GTG | GAG | CCC | GTC | AAG | CTG | GAG | TTT | GAA | AAG | GTC | TTT | |
| HHV6 | ACA | GAT | CGT | CTG | TTT | AAG | TCG | CCT | ATC | AAG | CTC | GAG | TTT | GAA | AAG | ATT | TTA | |
| EBV | ACC | CGG | AGC | CTG | TTT | GTG | GCC | CCC | ATC | TCC | CTG | GAG | GCC | GAG | AAG | ACC | TTC | |
| HSV1 | ACC | AAG | CTG | CTG | CTG | ATC | GCC | AAG | AAA | AAG | TAC | ATC | GGC | GTC | AT | | | |
| HSV2 | ACC | AAG | CTG | CTG | CTG | ATC | GCC | AAG | AAA | AAG | TAC | ATC | GGC | GTC | AT | | | |
| VZV | ATA | AAA | CTT | TTG | CTT | ATA | ACA | AAG | AAA | AAG | TAC | ATT | GGG | GTA | AT | | | |
| CMV | GTC | TCT | CTT | ATG | ATC | ATC | TGC | AAG | AAA | CGT | TAC | ATC | GGC | AAA | GT | | | |
| HHV6 | TGT | CCG | CTA | ATT | TTG | ATT | TGT | AAA | AAA | AGA | TAC | ATT | GGT | AGA | CA | | | |
| EBV | TCC | TGC | CTG | ATG | CTG | ATT | ACA | AAG | AAG | AGA | TAT | GTG | GGG | GTG | CT | | | |

FOJA SUSTITUIDA

10/13

FIGURA 4

| | | | | |
|--------|-----------------|--------------------------------------|-------------------|--------|
| HIV1 | IRYQYNVLPQGWKGS | PaIFQsSMTKILEP | FrkqnPdivIYQYMDDL | YVGS |
| HIV2 | KRYiYKVLPQGWKGS | PaIfQytMR?vLePFRkANpDviliQYMDDIL | IAS | |
| HTLVI | TRYAWTVLPQGFKN | SPTLFEQQLAAVLNPMRKMFPTSTIVQYMDDILLAS | | |
| HTLVII | TRYAWRVLPQGFKN | SPTLFEMQLAHILQPIRQAF | PQCTILQYMDDILLAS | |
| CON | RY | V PQG K S | L P | QYMD S |

HOJA SUSTITUIDA

11/13

FIGURA 5

HIV1 ATT AGA TAT CAG TAC AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG AAA GGA TCA CCA GCA ATA TTC CAA AGT
 HIV2 AAA AGA TAC ata TAT AAA GTC tta CCA CA? GGA TGG AAG GGA TCA CCA GCA ATT TtT CAA taC
 HTLV1 ACC AGA TAT GCA TGG ACT GTC CTT CCA CAG GGG TTT AAA AAC AGC CCC ACC CTG TTC GAA ATG
 HTLVII ACT AGA TAC GCC TGG AGA GTA CTA CCC CAA GGG TTT AAA AAT AGT CCC ACC C T T A
 HRVCON A GA TA T A

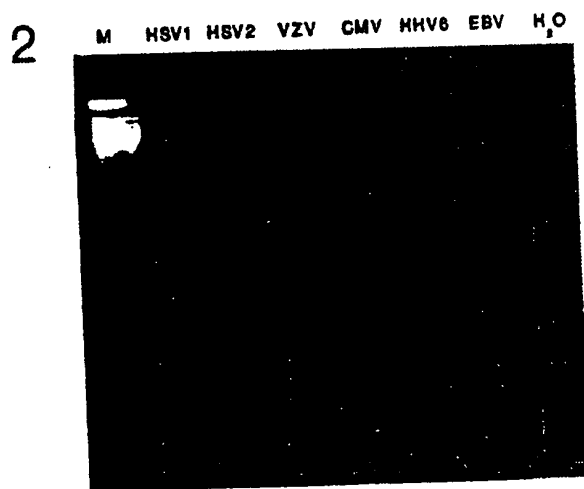
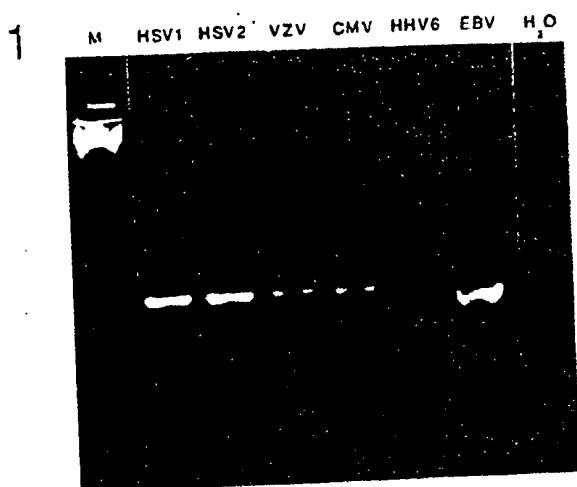
HIV1 AGC ATG ACA AAA ATC TTA GAG CCT TTT AGA AAA CAA aAT CCA GAC ATa gTt ATC TAT CAA TAC
 HIV2 aca ATG AGg CG? gTc TTA GAA CC? TTC AGA AAA GCA AAC cca GAt gTc ATT ?Tc aTc CAg TAC
 HTLV1 CAA TTA GCA GCC CAT ATC CTG CAG CCC ATT CGG AAA ATG TTT CCC CCA TGC ACT ATT CTT CAG TAC
 HTLVII CAG CTG GCC CAT T T A CC T
 HRVCON T
 TAC

HIV1 ATG GAT GAT GAT TTG TAT GTA GGA TCT
 HIV2 ATG GAT GAT ATC ATC tTa ATA Gct AGt
 HTLV1 ATG GAT GAC ATA CTT TTA GCC AGC
 HTLVII ATG GAT GAC ATT CTC CTG GCA AGC
 HRVCON ATG GAT GA T GC

HOJA SUSTITUIDA

12/13

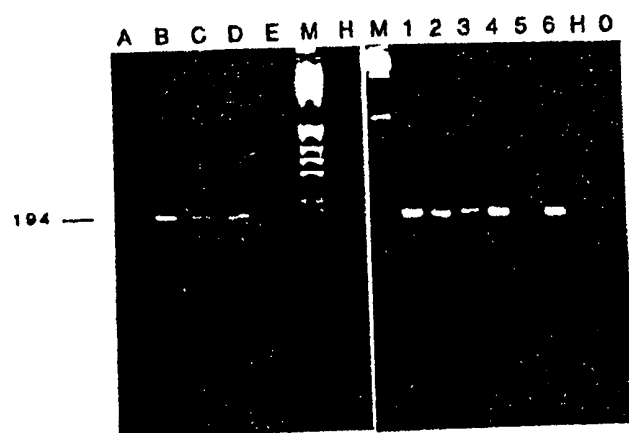
FIGURA 6



HOJA SUSTITUIDA

FIGURA 7

(a)



(b)

